

**Análise de CL₅₀, crescimento
e histologia branquial de tilápias do Nilo,
Oreochromis niloticus (Perciformes: Cichlidae)
submetidas a diferentes concentrações
de óleo de soja pós-cocção**

**An analysis of LC₅₀, growth,
and gill histology of Nile tilapia,
Oreochromis niloticus (Perciformes: Cichlidae)
exposed to varying concentrations
of used soybean oil**

FÁTIMA JULIANE MACHADO CERON * ^{1,2}
ANA TEREZA BITTENCOURT GUIMARÃES³

O despejo de resíduos em esgoto urbano, bem como o seu não tratamento, leva ao aumento de contaminações em corpos d'água (ISOLDI *et al.*, 2006). O Brasil produz nove bilhões de litros de óleo vegetal por ano, e deste volume produzido, 1/3 é destinado aos óleos comestíveis (OIL WORLD, 2011). De acordo com o Centro de Saúde Ambiental da Prefeitura Municipal de Curitiba, cerca de 100 toneladas de óleos vegetais utilizados na fritura por imersão destinam-se a procedimentos de reutilização, mas parte de seu volume é descartado diretamente no esgoto doméstico (COSTA NETO *et al.*, 2000).

Óleos vegetais são produtos naturais formados por ácidos graxos insaturados (COSTA NETO *et al.*, 2000), que apresentam esteróis (ITO *et al.*, 1973) e baixo ponto de fusão (LEHNINGER *et al.*, 2002). São

¹ Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brasil. ² Curso de Ciências Biológicas, Universidade Positivo, CEP 81280-330, Curitiba - PR, Brasil. ³ Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, CEP 85950-000, Palotina - PR, Brazil. *autor para correspondência: j.ceron@ufpr.br

substâncias que possuem compostos organopersistentes e contêm componentes tóxicos que podem produzir efeitos similares aos provenientes do petróleo (EPA, 2009). Afetam significativamente processos bioquímicos e funcionais de organismos vivos, incluindo efeitos tóxicos sobre a reprodução e desenvolvimento (PÉRSIC, 2005), assim como alterações celulares e mudanças comportamentais (FLEEGER *et al.*, 2003; EPA, 2009). Os efeitos destes compostos são dependentes do estágio de desenvolvimento do organismo afetado, assim como de sua composição específica, do tempo de permanência no ambiente e sua forma de ação diante de fatores físicos e químicos específicos (MONTEIRO, 2003). Além disso, MIRANDA & RIBEIRO (2006) relatam que os efeitos da ação à exposição aos estes compostos orgânicos dependem da dose de exposição aos organismos, de sua biodisponibilidade, da concentração, da metabolização e dos mecanismos de resposta celular provenientes dos organismos alvo.

Ainda não há legislação brasileira específica que regularize o descarte de óleos (SILVESTRE, 2007). A ANVISA determina que a utilização e descarte de óleos usados em fritura deve ter uma quantidade menor que 0,9% de ácidos graxos livres, que os compostos polares não excedam 25% e que os valores de ácido linolênico não sejam maiores que 2% (ANVISA, 2004). Contudo, o óleo de soja pode apresentar valores de ácido linolênico que ultrapassam este limite, apresentando valores médios de 4,52% (NEUZA *et al.*, 2005).

A portaria n° 240/92 dos Ministérios da Indústria e Energia e do Ambiente e Recursos Naturais, o decreto-lei n° 153/03 do Ministério das Cidades, e a Resolução Conama 362/05 (CONAMA – *Conselho Nacional do Meio Ambiente*) tratam, respectivamente, do licenciamento, gestão e punição, em ordem jurídica, caso o descumprimento no gerenciamento destes resíduos. A resolução Conama 20/86 sugere uma dose de 50 mg/L de óleos e graxos a serem lançados em corpos d'água (FUNDEMA, 2009), enquanto a Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, através da portaria n° 05/89 a reduz para o valor ≤ 30 mg/L (BRASIL, 1989).

Processos de fritura com óleo promovem o desmembramento de triglicerídeos, pela desidratação das moléculas de glicerol, promovendo a liberação da acroleína, uma substância potencialmente cancerígena que atua na destruição de fibras elásticas, comprometendo o funcionamento de artérias elásticas e promovendo o envelhecimento precoce das células epiteliais (FERNANDES & SILVA, 2006; TSUKUDA *et al.*, 2007). Apesar de ser encontrada naturalmente em baixas concentrações,

devido a peroxidação lipídica (TSUKUDA *et al.*, 2007), a elevada exposição ambiental à acroleína ($>0,7 \text{ mg/m}^3$) promove sintomas clínicos respiratórios severos. Em ratas, exposições agudas deste contaminante resultaram em hiperplasias e metaplasias do epitélio traqueal e bronquiolar, além de hemorragias e necroses (HERRERA-MARTÍNEZ *et al.*, 2006). Além destes sintomas, pode acarretar em efeitos agudos de inibição enzimática, reações cruzadas de DNA, hipertensão, taquicardia e imunotoxicidade (FERNANDES & SILVA, 2006).

A ingestão de gorduras oxidadas aumenta a peroxidação dos cromossomos, além de gerar um potencial carcinogênico pelo efeito cumulativo da dieta contínua e prolongada de compostos de maior toxicidade, como monômeros cíclicos e hidrocarbonetos poliaromáticos (COSTA NETO *et al.*, 2000). Adicionalmente, um estudo comprovou que a exposição à fumaça do óleo de cozinha sem proteção pode acarretar no diagnóstico de neoplasias (WU *et al.*, 2004).

Nos corpos d'água, devido aos óleos possuírem menor densidade, há a formação de filmes superficiais que impedem a incidência de luz e a oxigenação (MENDES *et al.*, 2005), comprometendo processos fotossintéticos de fitoplânctons, e migrações verticais de zooplânctons, pela redução da luminosidade (MONTEIRO, 2003). Traz malefícios a biota aquática pela bioacumulação, sendo transmitidos ao longo da cadeia alimentar (MARTÍNEZ-GOMÉZ *et al.*, 2006).

Peixes assimilam os agentes exógenos de maneira direta, por distintas vias, sendo por isso referenciados como bioindicadores (GUIMARÃES *et al.*, 2007). A investigação em nível celular do sistema branquial torna-se relevante, por ser a primeira porta para assimilação destes agentes, possibilitando a análise de alterações morfológicas em resposta ao estresse subletal ou crônico (MATAQUEIRO *et al.*, 2009).

Uma vez verificado que o descarte de óleos de soja pós-cocção ainda não está devidamente regulamentado, e que a sua eliminação no ambiente aquático pode promover alterações na fisiologia dos organismos afetados, o presente estudo teve como objetivos: 1) determinar a concentração letal média (CL_{50}) de óleo de soja pós-cocção em *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae); 2) identificar alterações em padrões de crescimento de *O. niloticus* submetidos a concentração de óleo de soja pós-cocção definido como referência de descarte ambiental para o estado do Rio Grande do Sul; 3) identificar alterações na morfologia celular branquial de *O. niloticus* submetidos a concentração de referência de descarte de óleo de soja pós-cocção.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram feitos no biotério da Universidade Positivo (Curitiba, PR). A amostra para o teste compôs-se de 135 juvenis de tilápias do Nilo (*O. niloticus*), com comprimentos entre 7-10 cm, selecionados randomicamente em uma piscicultura situada em Araucária (Paraná, Brasil).

Os testes foram realizados em ambiente aclimatizado, com temperatura em 24 °C e fotoperíodo de 12 horas. O pH foi aferido com auxílio de fita de pH duas vezes por semana, e devidamente ajustado a $7,4 \pm 0,5$. Foram também aferidas as medidas de oxigênio e temperatura, sendo mantidas, respectivamente, em 4 ± 1 mg/L e 22 ± 1 °C. A oferta de ração peletizada Purina® com teor de 38% de proteína foi feita duas vezes ao dia, em proporção a 5 % da biomassa total de cada aquário. A renovação de aproximadamente 15 % da água foi realizada semanalmente, exceto para o experimento de mensuração da CL_{50} .

Experimento 1: Foram preparados três aquários com capacidade de 45 l, aeração constante e termostato em 22 °C, cada qual com 15 peixes. Em cada aquário foram administradas concentrações diferenciadas de uma solução padrão de óleo de soja. Esta solução foi preparada a partir da cocção a temperatura de 250 °C, até atingir o ponto de fumaça (aproximadamente três horas), sendo posteriormente acondicionado em recipiente de vidro e resfriado até temperatura ambiente. A concentração administrada no aquário 1 foi de 30 mg/L (total de 1,35 mL), no aquário 2 foi de 60 mg/L (total de 2,70 mL) e no aquário 3 foi de 90 mg/L (total de 4,05 mL). A concentração administrada no aquário 1 foi a definida pela legislação do estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 1989). As mortalidades foram verificadas pelo período de dez dias.

Experimento 2: O segundo experimento foi delineado para comparar o crescimento dos animais sob diferentes tratamentos. Foram preparados dois aquários de 45 l, com aeração constante e termostato em 22 °C, cada qual com 15 tilápias. No aquário controle (C) não foi administrado óleo, enquanto o aquário tratamento (T) recebeu a concentração de 30 mg/L, conforme sugerido como valor de referência pelo Estado do Rio Grande do Sul. Uma vez por semana, por oito semanas, foram realizadas medidas de comprimentos padrão e total (com ictiômetro) e peso (com balança digital). A taxa de crescimento foi analisada conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de crescimento} = \frac{\text{valor em } t - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial} * 100}$$

Experimento 3: Para o terceiro experimento, objetivando identificar histopatologias branquiais, foram preparados 20 aquários de 5L, com aeração constante. Dez aquários foram considerados como controles, enquanto nos demais foi adicionada a concentração de 30 mg/L do óleo de soja pós-cozão. Em cada aquário foram colocadas três tilápias. Amostras do segundo arco branquial de três espécimes de cada grupo foram coletadas após 2 e 8 horas para determinar o efeito agudo do poluente. Para avaliar os efeitos crônicos, os arcos branquiais foram coletados semanalmente, por oito semanas. Para a coleta, os peixes foram individualmente e sequencialmente anestesiados em cepacaína 1:80 até entrar em letargia, para serem posteriormente sacrificados por secção medular.

O arco branquial de cada indivíduo coletado foi fixado em solução de ALFAC por 24 horas, e posteriormente transferido para álcool 70° para sua conservação. Em seguida, foram submetidos ao procedimento histológico de rotina, que confere a desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xileno seguido de impregnação e inclusão em parafina purificada. O material emblocado foi seccionado em micrótomo em cortes de 5 µm, para montagem das lâminas, coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina, e analisados pelo fotomicroscópio Olympus x-41, e o software de captação de imagem Image Pro-Plus.

Análise estatística: a CL_{50} foi calculada por meio do método de estimação não linear, por meio de cálculos de probitos (*Probit regression*), aplicando-se o método de estimação de Quasi-Newton. Os valores referentes às probabilidades previstas foram representados em diagrama de dispersão e a predição da CL_{50} definida a partir da aplicação da análise de regressão múltipla, a partir das probabilidades previstas.

Para avaliação do crescimento, os dados relativos às variáveis comprimentos padrão e total, e peso foram analisadas em relação ao padrão da distribuição por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez verificada a normalidade, foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas para avaliar a hipótese nula da ausência de diferença de variabilidade de crescimento entre os grupos controle e tratamento.

As histopatologias observadas foram analisadas por meio do Teste Qui-Quadrado para aderência, testando-se a hipótese nula de igualdade das frequências de patologias entre os grupos controle e tratamento. O nível de significância utilizado para todos os testes foi de 0,05. As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0.

RESULTADOS

No primeiro experimento, os valores relativos à mortalidades foram equivalentes a 87 % no tratamento de 90 mg/L, 40 % em 60 mg/L e 13 % em 30 mg/L. A CL_{50} foi estimada em 58,4 mg/L (Fig. 1).

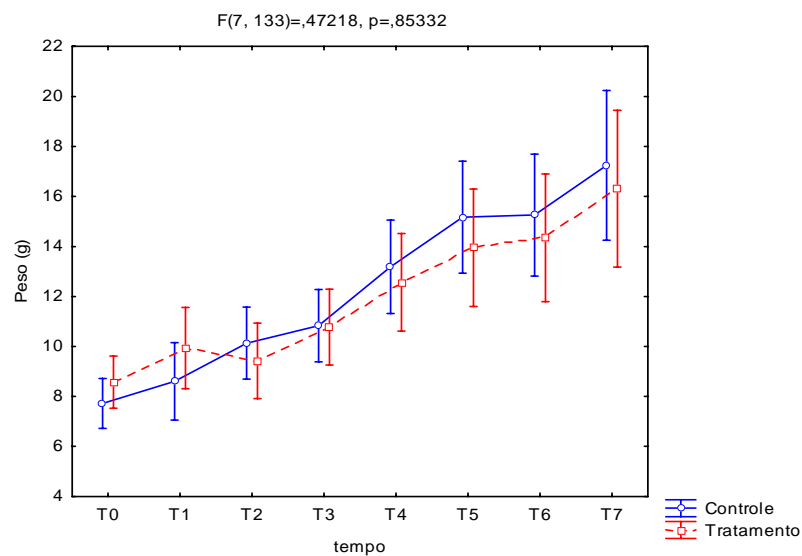
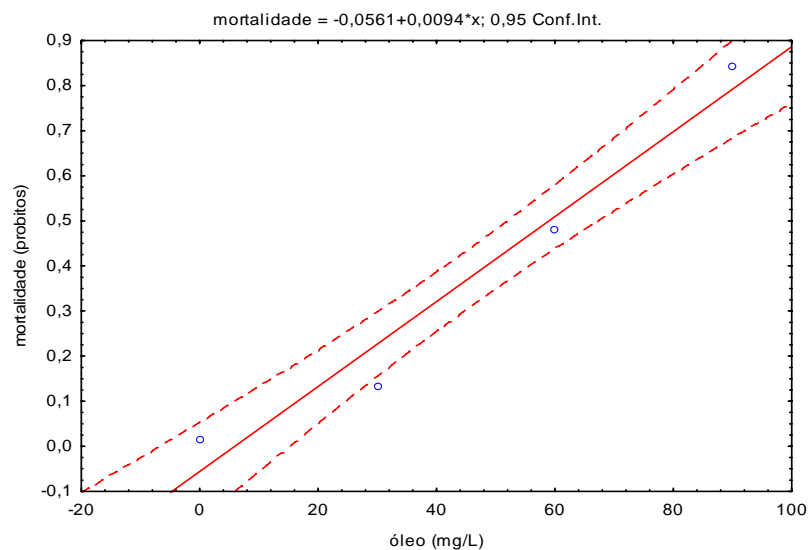
Em relação à avaliação do crescimento de *O. niloticus* submetidos a concentração de 30 mg/L de óleo de soja pós-cocção, foi possível verificar que não houve diferenças entre o grupo controle e o grupo tratamento em relação ao peso (Fig. 2), comprimento padrão (Fig. 3) e total (Fig. 4).

Ao avaliar os efeitos histopatológicos nas brânquias de peixes submetidos a concentração de 30 mg/L do óleo de soja pós-cocção, a análise foi realizada com os indivíduos sobreviventes, independente do tempo, devido a alta mortalidade ao longo do experimento.

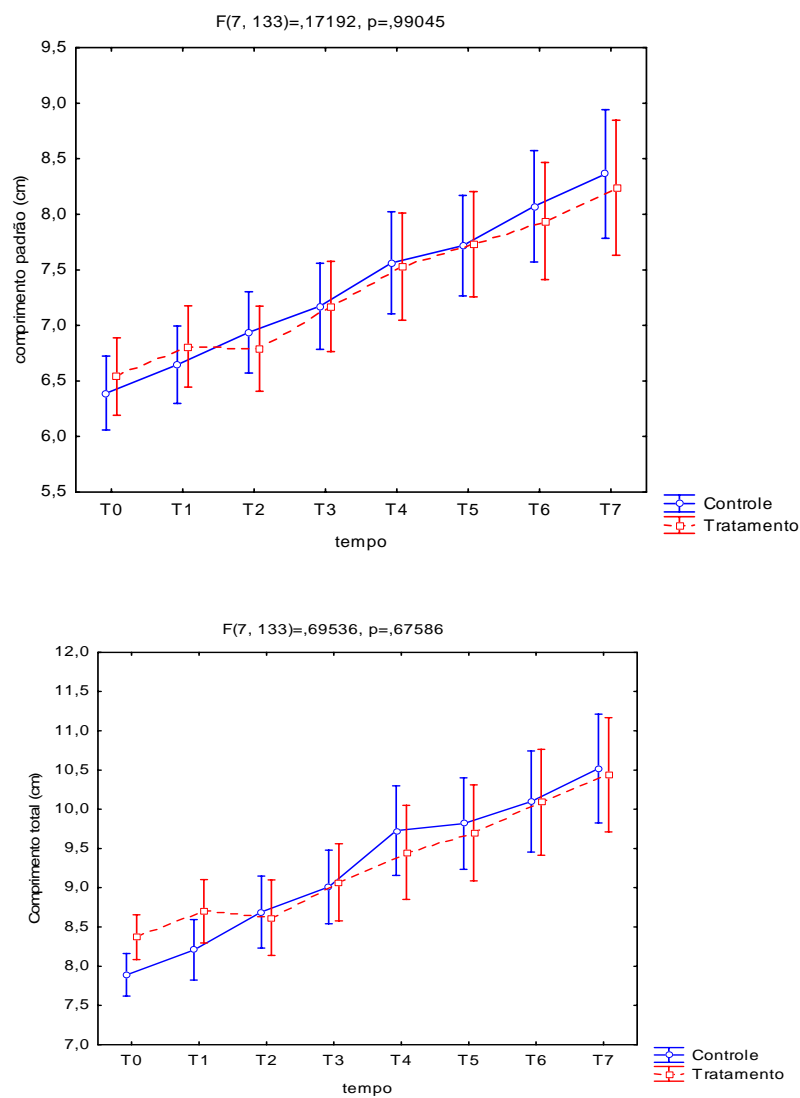
As histopatologias observadas em ambos os grupos foram: edema, congestão nas lamelas secundárias, hiperplasias e presença de parasitos mixozoários instalados nas lamelas secundárias branquiais (Fig. 5). Tais patologias foram observadas em proporções equivalentes em ambos os grupos ($\chi^2=0,351$; $p=0,986$) (Tabela 1).

Tabela 1. *Oreochromis niloticus*. Frequência de histopatologias observadas nos indivíduos do grupo controle (n=13) e tratamento (n=10), e os resultados da comparação estatística.

	C	T	p
Edema	100%	100%	1
Fusão	100%	100%	1
Congestão	40%	54%	0,15
Hiperplasia	60%	54%	0,25
Mixozoários	80%	69%	0,37



Figs 1-2. *Oreochromis niloticus* — 1, diagrama de dispersão das concentrações de óleos de soja pós-coccionados e probabilidades previstas de mortalidade (em cima); 2, média \pm intervalo de confiança de peso dos grupos controle e tratamento com óleo de soja pós-cocção (embaixo).



Figs 3-4. *Oreochromis niloticus* — 3, média \pm intervalo de confiança de comprimento padrão dos grupos controle e tratamento com óleo de soja pós-cocção (em cima); 4, média \pm intervalo de confiança de comprimento total dos grupos controle e tratamento com óleo de soja pós-cocção (embaixo).

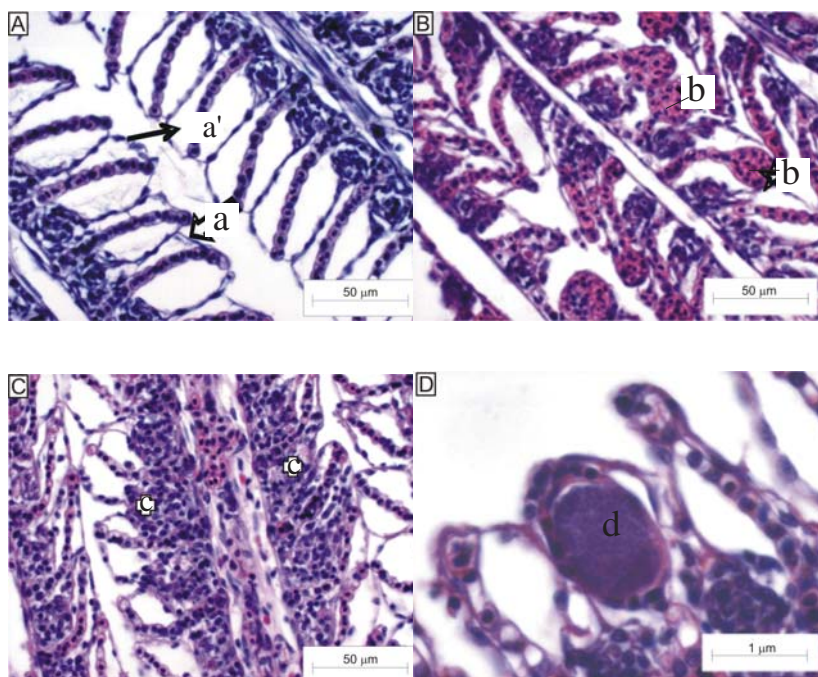


Fig. 5. *Oreochromis niloticus* — histopatologias observadas nos indivíduos dos grupos controle e tratamento A: Edemas (a') associados a fusão das lamelas secundárias (a). B: Congestão observada nas lamelas secundárias (b). C: Hiperplasias (c). D: Myxozoários localizados no interior da lamela secundária (d).

DISCUSSÃO

Atualmente, óleos vegetais são descartados no ambiente sem haver uma medida que minimize o impacto destes produtos. Programas que visem seu emprego em algumas técnicas de reciclagem, como a saponificação (ALBERICI & PONTES, 2004) e formação de biodiesel (FERRARI *et al.*, 2005) são poucos, e por vezes mal divulgados.

Não há registros da concentração que provoca a mortalidade de 50% de uma amostra para óleos vegetais pós coccionados. Assim, infere-se no presente estudo uma CL_{50} equivalente a 58,4 mg/L. Logo, a concentração limite sugerida pela Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (30 mg/L), que promoveu apenas 13% da mortalidade dos espécimes, pode ser considerada uma dosagem de referência.

Durante oito semanas, com a utilização da dose de 30 mg/L nas tilápias estudadas observou-se um crescimento de 26% em animais submetidos ao óleo, e 28% nos animais controle, havendo equivalência estatística entre os grupos. Tilápias do Nilo apresentam um crescimento rápido e adaptação ao confinamento, aceitando rações com grande facilidade (MEURER *et al.*, 2001). São resistentes a variações de temperaturas, incluindo a resistência às temperaturas elevadas, baixas concentrações de oxigênio dissolvido e altas concentrações de amônia na água (POPMA & PHELPS, 1998), sendo portanto, um excelente objeto de estudo em condições experimentais.

A hipótese inicial do presente estudo propunha que os animais submetidos à contaminação com o óleo apresentassem um menor crescimento, uma vez que esta espécie não utiliza eficientemente lipídeos como fonte energética, e altos níveis destas substâncias diminuem o aproveitamento do alimento (MEURER *et al.*, 2002; LAVOR & SADO, 2008), implicando em uma maior excreção de material fecal, e conseqüente aumento de carga poluente (MEURER *et al.*, 2002). Porém, esta hipótese não foi comprovada. Possivelmente pelo fato da alimentação ser a principal fonte de compostos nitrogenados, o maior aporte destas substâncias em um ambiente confinado pode ser a resposta para a equivalência das taxas de crescimento. Na água, a forma não ionizada de amônia pode comprometer a conversão do alimento em ATP, comprometendo o crescimento dos peixes (LAVOR & SADO, 2008).

Confinamentos em pequenos grupos podem desencadear a formação de hierarquias sociais entre os animais, com aumentos de mortalidade aos submissos (LAVOR & SADO, 2008) e aumentos de níveis de glicocorticóides, como o cortisol (GUIMARÃES & CALIL, 2008; LAVOR & SADO, 2008), que inibe a circulação do hormônio do crescimento, afetando diretamente nas taxas de peso (GUIMARÃES & CALIL, 2008).

Em relação à análise do epitélio respiratório das brânquias, também não foi observada a diferença significativa das patologias entre os grupos controle e experimental. Contudo, a elevada mortalidade observada entre os grupos restringe a interpretação. A alta mortalidade pode estar relacionada ao estresse ambiental e social, associado ao confinamento, que provoca ataques entre os espécimes, e afeta a defesa humoral, além do acréscimo de infecções nas brânquias (MEURER *et al.*, 2002).

As alterações morfológicas observadas nestas amostras são evidências de respostas fisiológicas ao estresse causado por um contaminante (LUPU *et al.*, 2007). Óleos são constituídos também de hidrocarbonetos poliaromáticos, que penetram facilmente na membrana biológica. Esta

ação pode provocar danos estruturais e funcionais às brânquias quando em doses subletais, já que estas são sensíveis a longas cadeias destes compostos (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Determina-se assim, com os resultados obtidos na análise de crescimento e histopatologias, que o fator causador da equivalência entre os grupos foi o ambiente atribuído a amostra, e não ao óleo, embora este possa ter contribuído como estressor. Sugere-se, portanto, que a elevação das doses de óleo podem causar malefícios a *O. niloticus*, principalmente por levar a mortalidade elevada em concentrações de 90 mg/L.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- o valor de CL_{50} do óleo de soja pós-cocção é de 58,4mg/L;
- não há diferença de crescimento em peso, comprimento padrão e comprimento total entre os grupos controle e tratados com a concentração de 30 mg/L;
- não há diferença de frequências de histopatologias dos arcos branquiais dos peixes dos grupos controle e tratados com a concentração de 30 mg/L.

Mais estudos devem ser realizados para comprovar o real efeito do óleo pós-cocção despejado em leitos de rios, para assim possibilitar a definição de um valor de referência para os destinos finais dos óleos utilizados nos processos de cocção de alimento, e que sirvam como base científica para a promoção de decisões sobre novas políticas mitigadoras da contaminação ambiental.

SUMMARY

The inappropriate disposal of cooking oil and its inadequate treatment results in pollution of lakes and rivers. This study reports three ecotoxicity tests on *Oreochromis niloticus* with used soybean oil. The bioassays consisted: Test 1 — determination of LC_{50} of soybean oil, with 30, 60 and 90 mg/L of concentrations. Test 2 — growth analysis of the specimens, during two months, from the administration of concentration of 30 mg/L, currently suggested as a reference value limit on Rio Grande do Sul for disposal of the cooking oil. Test 3 — exposure to the concentration of 30 mg/L and observation of the gill histology after exposure to 2 and 8 hours and weekly (during two months), evaluating the acute and chronic effects of this exposure, respectively. The estimated LC_{50} was $58,4 \pm 7,6$ mg/L. In others tests, the variables weren't different

between control and treatment groups. The concentration of 30 mg/L of oil, 1, apparently doesn't promote deleterious effects on *O. niloticus*.

KEY WORDS: tilapia; soybean-oil; LC₅₀; growth; histopathology.

RÉSUMÉ

La pièce de rebut inadéquate et le manque de traitement de l'huile de cuisine dans le résultat de l'égout urbain dans l'augmentation de contaminations de corps d'eau. Dans ce travail, trois épreuves de l'ecotoxicidade ont été accomplies dans *Oreochromis niloticus* avec huile de cuisine de la poudre du soja. Les répétitions expérimentales ont consisté: Testez 1 — dans la détermination de CL50 de l'huile de cuisine de la poudre du soja, avec les concentrations de 30, 60 et 90 mg/L. Testez 2 — analyse de l'augmentation, pour deux mois, commencer de l'administration de la concentration de 30 mg/L, valeur de la référence pour la pièce de rebut d'huile de cuisine, a maintenant suggéré dans l'état de Rio Grande du Sul. Testez 3 — exposition la concentration de 30 mg/L, et observation de l'histologia du branchial après 2 et 8 heures, et chaque semaine (pour deux mois), évaluer des effets brusquement et chronique de cette exposition, respectivement. Cher CL50 était de 58,4±7,6 mg/L de l'huile. Nous trop d'épreuves, les variables n'étaient pas différentes entre le contrôle des groupes et traitement. La concentration de 30 mg/L n'encourage pas apparemment tout effet malfaisant sur individus de l'espèce *O. niloticus*.

MOTS CLÉS: tilapia; soja-huile, LC₅₀; développement; histopathologie.

RESUMO

O descarte inadequado e a falta de tratamento do óleo de cozinha no esgoto urbano resultam no aumento de contaminações de corpos d'água. Neste trabalho, foram realizados 3 testes de ecotoxicidade em *Oreochromis niloticus* com óleo de soja pós-cocção. Os ensaios experimentais consistiram: Teste 1) na determinação da CL₅₀ do óleo de soja pós-cocção, com as concentrações de 30, 60 e 90 mg/L. Teste 2) análise de crescimento, durante dois meses, a partir da administração da concentração de 30 mg/L, valor de referência para o descarte de óleo de cozinha, sugerido atualmente no estado do Rio Grande do Sul. Teste 3) exposição a concentração de 30 mg/L, e observação da histologia branquial após 2 e 8 horas, e semanalmente (durante dois meses), para avaliar efeitos agudo e crônico desta exposição, respectivamente. A CL₅₀ estimada foi de 58,4±7,6 mg/L de óleo. Nos demais testes, as variáveis não foram diferentes entre os grupos controle e tratamento. A concentração de 30 mg/L aparentemente não promove nenhum efeito deletério sobre indivíduos da espécie *O. niloticus*. Desta forma, pode-se

sugerir sua utilização para regularizar a eliminação deste poluente no Brasil.

Palavras-chave: tilápia. óleo-de-soja, CL_{50} , crescimento, histopatologia.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERICI, R.M. & F.F. PONTES. 2004. Reciclagem de óleo comestível usado através da fabricação de sabão. *Engenharia Ambiental*, 1: 73-76.
- ANVISA – Associação Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. Acesso em www.anvisa.gov.br.
- BRASIL – Portaria nº 05/89, Secretaria de Saúde e Meio Ambiente, Porto Alegre, 16 de março de 1989.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. *Understanding oil spills and oil spill response: understanding oil spills in freshwater environments*. <<http://www.epa.gov/emergencies/content/learning/pdfbook.htm>> on 9 March 2009.
- COSTA NETO, P.R.; L.F.S. ROSSI; G.F. ZAGONEL & L.P. RAMOS. 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, 23, 531-537.
- FERRARI, R.A.; V.S. OLIVEIRA & A. SCABIO. 2005. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, 28: 19-23.
- FLEEGER, J.W.; K.R. CARMAN & R.M. NISBER. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of Total Environment*, 317: 207-233.
- FERNANDES, J.; S. SILVA. Acroleína. Portugal, 2006. 12 p. Porto University (FFUP). <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/acroleina/index.htm>> em Março de 2009.
- FUNDEMA — Fundação Nacional do Meio Ambiente. 2009. <www.fundema.sc.gov.br>
- GUIMARÃES, A.T.B.; H.C. SILVA de A. & W. BOEGER. 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 57-62.
- GUIMARÃES, A.T.B. & P. CALIL. 2008. Growth evaluation of *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Neopterygii) exposed to trichlorfon. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51: 323-332.
- HERRERA-MARTÍNEZ, J.; R.I. HERNÁNDEZ-GARCÍA & B.M. BERDEJA-MARTÍNEZ. 2006. Toxicidad de acroleína (contaminante ambiental) em tráquea y pulmones de ratas. *Bioquímica*, 31: 90-96.

- ISOLDI, L.A.; S.R.N. PIEDRAS; J.G. VIEIRA & S.S. CALDAS. 2006. Caracterização físico-química de efluentes de uma indústria de óleo vegetal. *Vetor*, 16: 21-24.
- ITOH T.; T. TAMURA & T. MATSUMOTO. 1973. Sterol composition of 19 vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50: 05-122.
- LAVOR, L.M.S. & R.Y. SADO. 2008. *Relação ambiente e sanidade de peixes*. Pós-graduação em clínica médica e cirúrgica de animais selvagens e exóticos. Universidade Castelo Branco, Brasília, Brasil.
- LEHNINGER, A.L.; D.L. NELSON & M.G. COX. 2002. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo.
- LUPI C.; N.I. NHACARINI; A.F. MAZON & O.R. SÁ. 2007. Avaliação de poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro – SP. *Revista Fafibe On Line*, 3.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; J.A. CAMPILLO; J. BENEDICTO; B. FERNÁNDEZ; J. VALDÉS & F. SÁNCHEZ. 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 53: 305-314.
- MATAQUEIRO, M.I.; J.P. SOUZA; C. CRUZ; E.C. URBINATI & L.S. NAKAGHI. 2009. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 124-129.
- MENDES, A.A., H.F. CASTRO; E.B. PEREIRA & A. FURIGO Jr. 2005. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, 28: 296-305.
- MEURER, F., C. HAYASHI; W.R. BOSCOLO & C.M. SOARES. 2001. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30.
- MEURER, F., C. HAYASHI; W.R. BOSCOLO & C.M. SOARES. 2002. Lipídeos na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31: 566-573.
- MIRANDA, A.L.C. & C.A. de O. RIBEIRO. 2006. *Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (Hoplias malabaricus) e seus efeitos in vitro em células do sistema imune de carpa (Cyprinus carpio)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

- MONTEIRO, A.G. 2003. *Metodologia de avaliação de custos ambientais provocados por vazamento de óleo: o estudo de caso do complexo REDUC-DTSE*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- NEUZA, J.; B.B.P. SOARES; V.M. LUNARDI & C.R. MALACRIDA. 2005. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Química Nova*, 28 (6): 947-951.
- OIL WORLD. 2011. Acesso em <http://www.oilworld.biz/app.php>
- PÉRSIC, A. 2005. *Modalités de contamination par les polluants organiques persistants des réseaux trophiques lagunaires*. Application de La méthode des isotopes stables. Paris. Tese de Doutorado, Paris XI Orsay, Paris, França.
- PIRES, A.M. & M.E. MATTIAZZO. 2005. *Efluentes da indústria processadora de batata x preservação do meio ambiente – ênfase no uso agrícola de resíduos*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PROCESSAMENTO DE BATATAS, 2005, Pouso Alegre. Anais...Itapetininga: Associação Brasileira da Batata.
- POPMA, T.J. & R.P. PHELPS. 1998. *Status report to commercial tilapia producers on monosex fingerling productions techniques*. In: SIMPÓSIO SUL AMERICANO DE AQUICULTURA. Recife. Anais... Florianópolis: SIMBRAQ.
- RIBEIRO, E.A.; E.S.E. FANTA & H.C.S. de ASSIS. 2007. *Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe Sphoeroides testudineus (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- SILVESTRE T. 2007. A parceria entre a ONG 4 Elementos e a Ecobras dá exemplo de sustentabilidade. *Revista Meio Ambiente*. Acesso em www.revistameioambiente.com.br
- TSUKUDA, E.; S. SATO; R. TAKAHASHI & T. SODESSAWA. 2007. Production of acrolein from glycerol over silica-supported heteropoly acids. *Catalysis Communications*. 8: 1349-1353.
- WU, M-T.; L-H. LEE; C-K. HO; S-C. WU; L-Y. LIN; B-H. CHENG *et al.* 2004. Environmental exposure to cooking oil fumes and cervical intraepithelial neoplasm. *Environmental Research*, 94: 25-32.